

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-026725

(43)Date of publication of application : 29.01.2003

(51)Int.Cl.

C08F 8/30
C07H 13/04
C07K 19/00
C12N 11/08

(21)Application number : 2001-213760

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 13.07.2001

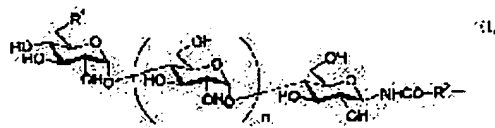
(72)Inventor : NISHIGUCHI SUSUMU
SHIBATANI SHIGEO
TODA ATSUSHI
NISHIMURA SHINICHIRO
KUROKOCHI MASAKI
YAMADA KURIKO
YUAN CHUAN LEE

(54) NOVEL MALTOSE-BONDED PROTEIN LIGAND AND ITS APPLICATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for easily and efficiently purifying a chimeric protein of a maltose-bonded protein and an enzyme and to provide a method for immobilizing the chimeric protein whereby the enzyme is difficultly released from the carrier.

SOLUTION: A maltose-bonded protein ligand prepared by bonding a group represented by formula (I) (wherein R1 is OH or NR3R4; R2 is a linker having a length equivalent to that of a chain of 1-20 methylene groups; R3 and R4 are each independently of each other are each H or a 1-4C alkyl; and n is an integer of 0-5) to a polymeric carrier.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-26725
(P2003-26725A)

(43) 公開日 平成15年1月29日 (2003.1.29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	7-71-ト [*] (参考)
C 0 8 F 8/30		C 0 8 F 8/30	4 B 0 3 3
C 0 7 H 13/04		C 0 7 H 13/04	4 C 0 5 7
C 0 7 K 19/00		C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
C 1 2 N 11/08		C 1 2 N 11/08	4 J 1 0 0

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2001-213760(P2001-213760)

(22) 出願日 平成13年7月13日 (2001.7.13)

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願 (平成13年度新エネルギー・産業技術総合開発機構「グリコクラスター制御生体分子合成技術」委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 西口 進

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 柴谷 滋郎

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 戸田 篤志

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なマルトース結合蛋白質リガンドとその利用

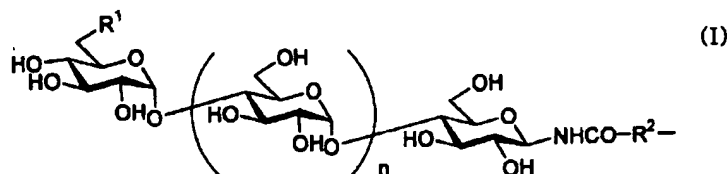
(57) 【要約】

【課題】 マルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質の容易で、効率よい精製方法および酵素脱離の起こりにくい該融合蛋白質の固定化方法を提供する。

【解決手段】 高分子担体上に一般式 (I) (式中、R¹はOHまたはNR³R⁴、R²はメチレン基1~20個分の

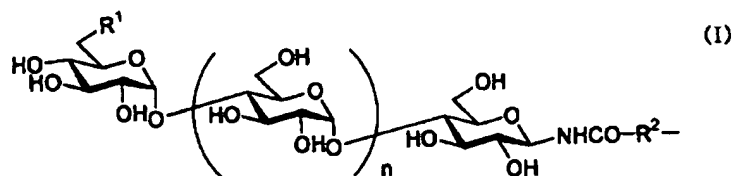
の長さを有するリンカー、R³およびR⁴は独立してHまたは炭素数1~4のアルキル基を示し、nは0~5までの整数を示す) で表される基が結合したマルトース結合蛋白質リガンド。

【化1】



【特許請求の範囲】

【請求項1】 高分子担体上に一般式 (I)



(式中、R¹はOHまたはNR³R⁴、R²はメチレン基1～20個分の長さを有するリンカー、R³およびR⁴は独立してHまたは炭素数1～4のアルキル基を示し、nは0～5までの整数を示す)で表される基が結合していることを特徴とするマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項2】 R²が式 (II)

【化2】

(式中、R⁵は炭素数1～19のアルキル基、R⁶はO、SあるいはNHを示し、R⁶を介して高分子担体と

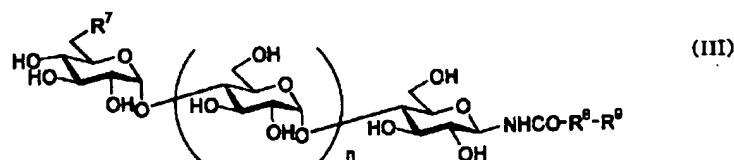
【化1】

結合している)で表される基である請求項1に記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項3】 高分子担体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類よりなる群から選択されるビニル化合物の重合体または共重合体あるいは多糖である請求項1または2に記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項4】 一般式 (III)

【化3】



(式中、R⁷はOHまたはNR¹⁰R¹¹、R⁸はメチレン基1～19個分の長さを有するリンカー、R⁹はNH₂、SH、OCOCH=CH₂、OCOC(CH₃)=CH₂、NHCOCH=CH₂またはNHCOC(CH₃)=CH₂、R¹⁰およびR¹¹は独立してHまたは炭素数1～4のアルキル基を示し、nは0～5までの整数を示す)で表されることを特徴とするマルトオリゴ糖誘導体。

【請求項5】 R⁸が炭素数1～19のアルキレン基である請求項4に記載のマルトオリゴ糖誘導体。

【請求項6】 R⁹がNH₂またはSHであるものを除く請求項4あるいは5に記載のマルトオリゴ糖誘導体および少なくとも1種類のビニル系単量体とを含むことを特徴とする共重合体からなるマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項7】 ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれる請求項6に記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項8】 架橋剤として少なくとも1種類の分子内に重合性ビニル基を2個以上有するビニル系単量体を含む共重合体からなる請求項6または7に記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項9】 架橋剤がN、N'-メチレンビスアクリルアミド、メタクリル酸ビニル、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジビニルベンゼンからなる群より選ばれる請求項8に記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項10】 R⁹がNH₂またはSHであるものを除く請求項4あるいは5に記載のマルトオリゴ糖誘導体と少なくとも1種類のビニル系単量体の共重合体が1:10～100000である共重合体からなる請求項6～9のいずれかに記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項11】 架橋剤の割合が0.1～20%である共重合体からなる請求項8～10のいずれかに記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項12】 請求項1～3または6～11のいずれかに記載のマルトース結合蛋白質リガンドにマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質が結合されていることを特徴とする固定化酵素。

【請求項13】 酵素が糖転移酵素である請求項12に記載の固定化酵素。

【請求項14】 糖転移酵素がβ1,4-ガラクトース転移酵素である請求項13に記載の固定化酵素。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は新規なマルトオリゴ糖誘導体および該マルトオリゴ糖誘導体の構造を部分構造として有する高分子に関する。また、本発明は該マルトオリゴ糖誘導体構造を部分構造として有する高分子を利用した固定化酵素に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年遺伝子組換え技術が進歩し、種々の酵素が大腸菌をはじめとする細菌類で生産されるように

なった。しかし、ヒトなどの高等動物由来の酵素を発現させようとしたとき、発現蛋白質が不溶性のインクルージョンボディを形成し、酵素活性を発現できないことがしばしばあり、このようなときの有効な解決手段として、目的とする酵素を他の蛋白質、例えばマルトース結合蛋白質（以下、MBPと示す）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの融合蛋白質として発現させるという方法が用いられる。例えば、MBPとの融合蛋白質として発現させる方法は特許第2703770号公報に開示されている。その中で、可溶性蛋白質として発現できる他に、MBPのマルトース結合性を利用して、融合蛋白質を精製できるという利点がある。精製には架橋アミロースを担体とするアフィニティクロマトグラフィーが用いられており、アミロースレジンという商品名でその担体は市販されている。しかし、架橋アミロースとMBPの結合は必ずしも強いものではなく、場合によっては酵素が吸着しなかったり、吸着が弱く溶出前の洗浄の時点で酵素が溶出してしまい十分に精製できないことがある。これは、MBPの基質特異性に起因しており、より親和性の高い担体を用いることにより克服できる。

【0003】また、架橋アミロースに吸着した酵素は固定化酵素としても利用でき、担体との親和性が十分でないときには酵素を結合できなかったり、一旦固定化された酵素が脱離してくる。固定化酵素を調製すると言う点からもより親和性の高い担体が望まれる。

【0004】マルトオリゴ糖鎖を側鎖に有する高分子としては、エピクロロヒドリンを用いてアガロースなどにマルトオリゴ糖を結合させたものがあるが、マルトオリゴ糖鎖の密度をコントロールできないため、オリゴ糖鎖がMBPと酵素の融合蛋白質との結合に必ずしも有効に利用されているとはいえない。この他には、マルトオリゴ糖と分子内にアミノ基と重合性ビニル基を有する化合物とを還元アミノ化により結合させ、重合性ビニル基を重合させることによりマルトオリゴ糖鎖を側鎖にもつ高

分子を得る方法がある。しかし、この方法ではオリゴ糖鎖の還元末端にある糖が開環してしまうため、貴重な糖鎖の糖残基が1つ減ってしまうという欠点がある。また、還元アミノ化ではシアノ水素化ホウ素ナトリウムのような有毒な物質を用いるため危険であるという欠点もある。

【0005】特開2001-40046号では、簡便に調製でき、架橋アミロースより親和性の高い担体としてマルトオリゴ糖を担持させた高分子が開示されている。しかし、MBPとの親和性はマルトオリゴ糖残基が担っており、マルトオリゴ糖残基部分を化学修飾することにより、まだまだ親和性を向上させる余地がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、MBPとより親和性の高い高分子担体を用い、MBPと酵素との融合蛋白質を容易に、効率よく、分離精製する方法および容易に、効率よく、しかも酵素脱離の起こりにくい固定化方法を提供することにある。

【0007】

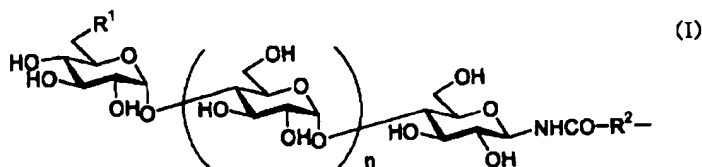
【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題を解決するために鋭意検討した結果、新規なマルトオリゴ糖誘導体を合成し、該マルトオリゴ糖誘導体が担持された高分子を得ることにより、上記問題点を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) 一般式(I) (式中、 R^1 はOHまたは NR^3R^4 、 R^2 はメチレン基1~20個分の長さを有するリンカー、 R^3 および R^4 は独立してHまたは炭素数1~4のアルキル基を示し、 n は0~5までの整数を示す)で表される基が結合していることを特徴とするマルトース結合蛋白質リガンド。

【0009】

【化4】



【0010】(2) R^2 が式(II) (式中、 R^5 は炭素数1~19のアルキレン基、 R^6 はO、SあるいはNHを示し、 R^6 を介して高分子担体と結合している)で表される基である(1)のマルトース結合蛋白質リガンド。

【0011】

【化5】

【0012】 R^5 が高分子担体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、ス

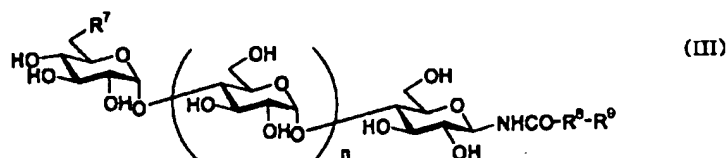
チレン類、脂肪酸ビニルエステル類よりなる群から選択されるビニル化合物の重合体または共重合体あるいは多糖である(1)または(2)のマルトース結合蛋白質リガンド。

(4) 一般式(III) (式中、 R^7 はOHまたは $NR^{10}R^{11}$ 、 R^8 はメチレン基1~19個分の長さを有するリンカー、 R^9 は NH_2 、SH、 $OCOCH=CH_2$ 、 $OCOCH(CH_3)=CH_2$ 、 $NHCOCH=CH_2$ または $NHCOCH(CH_3)=CH_2$ 、 R^{10} および R^{11} は独立してHまた

は炭素数1～4のアルキル基を示し、nは0～5までの整数を示す)で表されることを特徴とするマルトオリゴ糖誘導体。

【0013】

【化6】



【0014】(5) R⁸が炭素数1～19のアルキレン基である(4)のマルトオリゴ糖誘導体。

(6) R⁹がNH₂またはSHであるものを除く(4)あるいは(5)のマルトオリゴ糖誘導体および少なくとも1種類のビニル系単量体を含むことを特徴とする共重合体からなるマルトース結合蛋白質リガンド。

(7) ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれる

(6)のマルトース結合蛋白質リガンド。

(8) 架橋剤として少なくとも1種類の分子内に重合性ビニル基を2個以上有するビニル系単量体を含む共重合体からなる(6)または(7)のマルトース結合蛋白質リガンド。

(9) 架橋剤がN, N'-メチレンビスアクリルアミド、メタクリル酸ビニル、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジビニルベンゼンからなる群より選ばれる

(8)のマルトース結合蛋白質リガンド。

(10) R⁹がNH₂またはSHであるものを除く(4)あるいは(5)のマルトオリゴ糖誘導体と少なくとも1種類のビニル系単量体の共重合比が1:10～1000である共重合体からなる(6)～(9)のいずれかのマルトース結合蛋白質リガンド。

(11) 架橋剤の割合が0.1～20%である共重合体からなる(8)～(10)のいずれかのマルトース結合蛋白質リガンド。

(12) (1)～(3)または(6)～(11)のいずれかのマルトース結合蛋白質リガンドにマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質が結合されていることを特徴とする固定化酵素。

(13) 酵素が糖転移酵素である(12)の固定化酵素。

(14) 糖転移酵素がβ1, 4-ガラクトース転移酵素である(13)の固定化酵素。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を挙げて詳細に説明する。本発明のマルトース結合蛋白質リガンドは高分子担体上に上記一般式(I)で表される基が結合している。式中、R¹はOHまたはNR³R⁴、R²はメチレン基1～20個分の長さを有するリンカー、R³およびR⁴は独立してHまたは炭素数1～4のアルキル

基を示し、nは0～5までの整数を示す。R²のメチレン基1～20個分の長さを有するリンカーとしては、例えば上記式(II)で表される基(式中、R⁵は炭素数1～19のアルキレン基、R⁶はO、SあるいはNHを示す)が例示され、R⁵の炭素数1～19のアルキレン基としては、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、ヘキシレン基、オクチレン基、ドデシレン基、オクタドデシレン基などが、R³およびR⁴の炭素数1～4のアルキル基としてはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基などが挙げられる。

【0016】本発明のマルトース結合蛋白質リガンドとしては、R¹、R²およびnは任意に組み合わせることができる。

【0017】本発明で用いることのできる高分子担体は、一般式(I)で表される基が結合できるものであれば特に制限はなく、例えばアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類よりなる群から選択されるビニル化合物の重合体または共重合体あるいは多糖などが挙げられる。アクリルアミド類としてはアクリルアミドやN-メチルアクリルアミド、N-エチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミドなどのN-アルキルアクリルアミド類などが例示される。メタクリルアミド類としてはメタクリルアミド、N-メチルメタクリルアミドやN-イソプロピルメタクリルアミドなどのN-アルキルメタクリルアミド類などが例示される。アクリル酸エステル類としてはアクリル酸メチル、アクリル酸エチル、アクリル酸ヒドロキシエチル、アクリル酸ジメチルアミノエチルなどが例示される。メタクリル酸エステル類としてはメタクリル酸メチル、メタクリル酸エチル、メタクリル酸ヒドロキシエチル、メタクリル酸ジメチルアミノエチルなどが例示される。スチレン類としてはスチレン、p-ヒドロキシスチレンなどが例示される。脂肪酸ビニルエステル類としては酢酸ビニル、酪酸ビニルなどが例示される。多糖としてはセルロース、キチン、キトサンや架橋アガロース、架橋デキストランなどの架橋された多糖などが例示される。また、ここに挙げた高分子担体は、一般式(III)で表されるマルトオリゴ糖誘導体を結合させるため適当な方法で活性化されたものも含まれる。さらに、本発明中の脂肪酸ビニルエステルの重合体あるいは共重合体には、重合反応後ア

ルカリなどによりエステル結合を全部あるいは一部加水分解したものも含まれる。

【0018】本発明の高分子担体上に一般式(I)で表される基が結合しているマルトース結合蛋白質リガンドは、 R^9 が NH_2 または SH であるものを除く一般式(II I)で表されるマルトオリゴ糖誘導体とビニル系単量体とを共重合あるいは高分子担体上にグラフト共重合させること、あるいは R^9 が NH_2 または SH である一般式

(III)で表されるマルトオリゴ糖誘導体を上記高分子担体上の適当な官能基と結合させることにより得ることができる。共重合はラジカル重合、カチオン重合、アニオン重合などの手法を用いることにより行うことができ、通常ペルオキシ二硫酸アンモニウムなどを触媒とするラジカル重合により行うことができる。共重合させるとき架橋剤を共存させてもかまわない。利用できる架橋剤としては、分子内に重合性ビニル基を2個以上有するビニル系単量体であれば特に制限はなく、 N 、 N' -メチレンビスアクリルアミド、メタクリル酸ビニル、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジビニルベンゼンなどが開示される。また、上記マルトオリゴ糖誘導体とビニル系単量体との共重合比は1:5~1000000が好ましく、特に1:10~1000000が好ましい。さらに、架橋剤を用いるときは、上記マルトオリゴ糖誘導体と上記ビニル系単量体の合計量に対してその割合が、0.05~30%が好ましく、0.1~20%が特に好ましい。 R^9 が NH_2 または SH である一般式(III)で表されるマルトオリゴ糖誘導体を高分子担体に結合させる方法としては特に制限はないが、高分子担体上の官能基を適当な方法で活性化させておくのが好ましい。例えば、高分子担体上の官能基がカルボキシル基の場合は N -ヒドロキシコハク酸イミド基などに、チオール基の場合は2-ピリジルジスルフィド基などに活性化させておくのが好ましい。

【0019】本発明の一般式(III)で表されるマルトオリゴ糖誘導体は、通常用いられている各種有機合成化学的な手法により合成することができる。例えば、 R^7 が OH 、 R^9 が NH_2 または SH の場合、マルトオリゴ糖をアンモニウム塩と反応させてグリコシルアミンとし、カルボジイミドに代表される縮合剤存在下に N -保護- ω -アミノ脂肪酸あるいは S -保護- ω -メルカプト脂肪酸と反応させた後、 N -保護基あるいは S -保護基を脱保護することにより得ることができる。また、 R^7 が NH_2 、 R^9 が SH の場合、上記と同様の方法で S -保護- ω -メルカプト脂肪酸と縮合させるところまで行い、その後非還元末端のグルコース残基の4、6位をベンザルプロミドなどを用いて選択的にベンジリデン化し、さらに残存する OH 基を無水酢酸などを用いてアセチル化する。アセチル化した後、 N -ブromoコハク酸イミドなどにより6位を選択的に開裂し、次いでアジ化ナトリウムで処理することにより6位をアジ化する。接触還元

によりアジ基をアミノ基に還元すると同時に4位のベンゾイル基を脱保護し、さらにナトリウムメチラートなどを用いて脱アセチル化、 S -保護基を脱保護することにより得ることができる。さらに、 R^7 が NH_2 、 R^9 が $NHCOCH=CH_2$ の場合、まずマルトオリゴ糖をベンジルアルコールで1位をベンジル化する。次いでベンザルプロミドなどを用いてマルトオリゴ糖の非還元末端グルコース残基の4、6位を選択的にベンジリデン化した後、同様に残存する OH 基を無水酢酸などによるアセチル化、 N -ブromoコハク酸イミドなどによる6位の選択的開裂、アジ化ナトリウムによる6位のアジ化、ナトリウムメチラートによる脱アセチル化、接触還元によるアジ基のアミノ基への還元と4位ベンゾイル基の脱保護を行う。さらに、アミノ基を適当な保護基で保護することにより、還元末端のグルコース残基の6位 OH 基が保護されたアミノ基で置換されたマルトオリゴ糖が得られる。得られたマルトオリゴ糖を上記と同様の方法でグリコシルアミンとし、 N -保護- ω -アミノ脂肪酸と縮合させた後、 ω -アミノ基の保護基を脱保護する。さらに、塩化アクリロイルなどによりアクリロイル化した後、残るアミノ基の保護基を脱保護することにより目的のマルトオリゴ糖誘導体を得ることができる。 N -保護- ω -アミノ脂肪酸の保護基と非還元末端グルコース残基の6位アミノ基の保護基はそれぞれ異なる条件で脱保護される必要があり、その組み合わせとしては、例えば N -保護- ω -アミノ脂肪酸の保護基としてベンジルオキシカルボニル基、非還元末端グルコース残基の6位アミノ基の保護基として t -ブトキシカルボニル基の組み合わせなどが挙げられる。

【0020】本発明の固定化酵素に用いることのできるマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質は、マルトース結合性を有しているマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質であれば、特に制限はなく、一般的には遺伝子組換え手法を利用して得ることができる。また、酵素は目的とする酵素活性を有していれば必ずしも酵素蛋白質全体である必要はなく、その断片であっても構わない。利用できる酵素としては特に制限はないが、糖転移酵素が好ましい。糖転移酵素としては、ガラクトース転移酵素、 N -アセチルグルコサミン転移酵素、フコース転移酵素、シアル酸転移酵素、マンノース転移酵素、 N -アセチルガラクトサミン転移酵素、キシロース転移酵素、グルクロン酸転移酵素などが挙げられる。

【0021】本発明の固定化酵素は、上記マルトオリゴ糖誘導体が結合した高分子担体あるいは上記マルトオリゴ糖誘導体とビニル系単量体との共重合体と上記融合蛋白質とを適当な溶液中で接触させることにより調製することができる。用いることのできる溶液としては、融合蛋白質の酵素活性が失活しないものであれば特に制限はないが、通常 pH 7付近の緩衝液が用いられる。必要に応じて、融合蛋白質を安定化させるような添加剤、例え

ば、2-メルカプトエタノールなどのような還元剤やカルシウム、マグネシウム、マンガンなどの金属塩を添加しても構わない。共重合体あるいはグラフト共重合体と融合蛋白質とは上記緩衝液中で、通常0~40℃で5分~24時間接触させる。このとき穏やかに振とうさせてもよい。

【0022】

【実施例】以下に、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はかかる実施例により限定されるものではない。

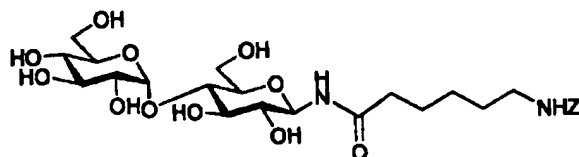
【0023】参考例1 [6-(N'-ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノイル]-β-マルトシルアミンの合成

マルトース5gと炭酸水素アンモニウム39.8gを蒸留水50mlに溶かし、室温で5日間攪拌した。反応後、反応溶液を減圧下で濃縮し、炭酸水素アンモニウム

の匂いが消えるまでトルエンで共沸を繰り返した。その残渣と6-N-(ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノ酸4gを乾燥ジメチルホルムアミド100mlに溶かし、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド4.0gと1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水合物3.2gを加え、室温で24時間攪拌した。反応後、反応溶液をクロロホルムで洗浄し、水で抽出を行ない、減圧下で濃縮した。この残渣をSephadex LH-20カラムクロマトグラフィー(溶出液 95%エタノール)を用いて精製し、目的物3.5gを得た。[6-(N'-ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノイル]-β-マルトシルアミンは下記構造式(式中、Zはベンジルオキシカルボニル基を示す)を有する。

【0024】

【化7】



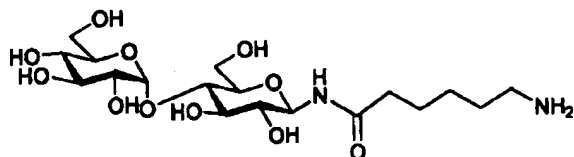
【0025】実施例1 6-アミノヘキサノイル-β-マルトシルアミン

参考例1で得た[6-(N'-ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノイル]-β-マルトシルアミン100mgをメタノール30mlに溶かし、10%パラジウム炭素30mgを加え、水素雰囲気下で室温で24時

間攪拌した。反応溶液をセライトろ過した後、ろ液を減圧下で濃縮し、目的物72mgを得た。6-アミノヘキサノイル-β-マルトシルアミンは下記構造式を有する。

【0026】

【化8】



【0027】参考例2 ベンジルマルトシドの合成

マルトース17.1gとベンジルアルコール54gをとり、これにH⁺型にした陽イオン交換樹脂Dowex 50WX-8(ダウケミカル製)3gを加え、5時間還流した。反応後、Sephadex LH-20(アマシヤムファルマシア製)カラムクロマトグラフィー(溶出液 95%エタノール)を用いて精製し、目的物4.3gを得た。

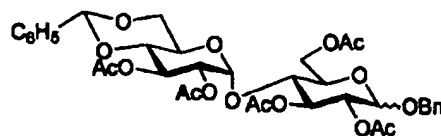
【0028】参考例3 ベンジル2,3,6,2',3'-ペンター-O-アセチル-4',6'-O-ベンジリデン-マルトシドの合成

参考例2で得たベンジルマルトシド4.3gをピリジン50mlに溶かし、ベンザルプロミド2.75gを加えて65℃にて1時間攪拌した。その反応溶液を室温に戻した後に無水酢酸120mlを加え、室温で24時間攪拌した。反応溶液をクロロホルムで抽出した後、飽和炭

酸水素ナトリウム水溶液、次いで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ、セライトろ過で硫酸ナトリウムを除いた後、ろ液を減圧下で濃縮した。その残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液 トルエン:酢酸エチル=2:1)で精製し、目的物2.5gを得た。ベンジル2,3,6,2',3'-ペンター-O-アセチル-4',6'-O-ベンジリデン-マルトシドは下記構造式(式中、Acはアセチル基、Bnはベンジル基を示す)を有する。

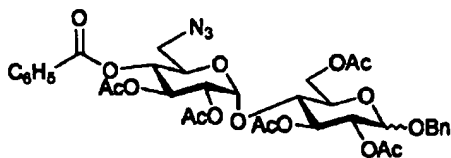
【0029】

【化9】



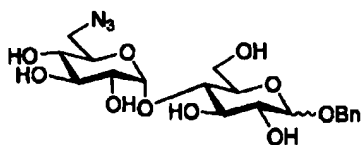
【0030】参考例4 ベンジル2, 3, 6, 2', 3'-ペンター-O-アセチル-6'-アジド-4'-O-ベンゾイル-6'-デオキシ-マルトシドの合成
参考例3で得たベンジル2, 3, 6, 2', 3'-ペンター-O-アセチル-4', 6'-O-ベンジリデン-マルトシド1.5gを乾燥ジクロロエタン50mlと四塩化炭素100mlからなる混合溶媒に溶かし、N-ブロモコハク酸イミド1.1gと炭酸バリウム230mgを加えて、65℃で3時間攪拌した。その後、反応溶液にジメチルホルムアミド100mlとアジ化ナトリウム2gを加え、120℃にて24時間攪拌した。反応溶液をクロロホルムで抽出した後、水で洗浄し、減圧下で濃縮した。その残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶出液 トルエン：酢酸エチル=2：1）にて精製し、目的物400mgを得た。ベンジル2, 3, 6, 2', 3'-ペンター-O-アセチル-6'-アジド-4'-O-ベンゾイル-6'-デオキシ-マルトシドは下記構造式（式中、Acはアセチル基、Bnはベンジル基を示す）を有する。

【0031】
【化10】



【0032】参考例5 ベンジル6'-アジド-6'-デオキシ-マルトシドの合成
参考例4で得たベンジル2, 3, 6, 2', 3'-ペンター-O-アセチル-6'-アジド-4'-O-ベンゾイル-6'-デオキシ-マルトシド310mgを乾燥メタノール50mlに溶かし、1.66Mナトリウムメチラート-メタノール溶液2.9mlを加え、室温で24時間攪拌した。反応溶液をH⁺型にした陽イオン交換樹脂Dowex 50WX-8（ダウケミカル製）を用いて、pH7に中和した後、樹脂をろ別した。ろ液を減圧濃縮して、目的物174mgを得た。ベンジル6'-アジド-6'-デオキシ-マルトシドは下記構造式（式中、Bnはベンジル基を示す）を有する。

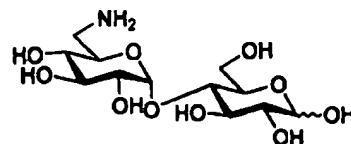
【0033】
【化11】



【0034】参考例6 6'-アミノ-6'-デオキシ-マルトース
参考例5で得た。ベンジル6'-アジド-6'-デオキ

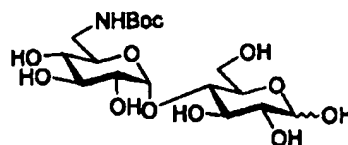
シーマルトシド137mgをメタノール30mlに溶かし、10%パラジウム炭素30mgを加え、水素雰囲気下で24時間攪拌した。反応液をセライトろ過した後、ろ液を減圧濃縮し、目的物97mgを得た。6'-アミノ-6'-デオキシ-マルトースは下記構造式を有する。

【0035】
【化12】



【0036】参考例7 6'-t-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-マルトースの合成
参考例6で得た6'-アミノ-6'-デオキシ-マルトース68mgをジオキサン-水（2：1）10mlに溶かし、1N水酸化ナトリウム水溶液0.2mlとジ-t-ブチルジカーボネート48mgを加えた。室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。Sephadex G-10（アマシャムファルマシア製）カラムクロマトグラフィー（溶出液 蒸留水）を用いて精製し、目的物79mgを得た。6'-t-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-マルトースは下記構造式（式中、Bocはt-ブトキシカルボニル基を示す）を有する。

【0037】
【化13】



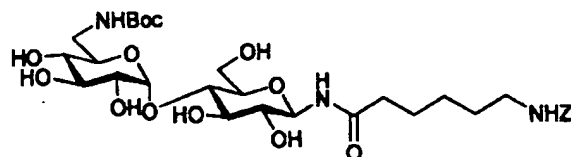
【0038】参考例8 6-(N'-ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノイル6'-t-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミンの合成
参考例7で得た6'-t-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-マルトース66mgと炭酸水素ナトリウム0.4gを蒸留水5mlに溶かし、室温で5日間攪拌した。反応後、反応溶液を減圧下で濃縮し、炭酸水素アンモニウムの匂いが消えるまでトルエンで共沸を繰り返した。その残渣と6-N-(ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノ酸44mgを乾燥ジメチルホルムアミド5mlに溶かし、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド45mgと1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水合物36mgを加え、室温で24時間攪拌した。反応後、反応溶液をクロロホルムで洗浄し、水で抽出を行ない、減圧下で濃縮した。この残渣をSephadex LH-20カラムクロマトグラフィー（溶出液 95%エタノール）を用

いて精製し、目的物 44 mg を得た。6-(N'-ベンジルオキシカルボニル)- α -アミノヘキサノイル 6'- α -ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ- β -マルトシルアミンは下記構造式(式中、Boc は α -ブト

キシカルボニル基、Z はベンジルオキシカルボニル基を示す)を有する。

【0039】

【化14】



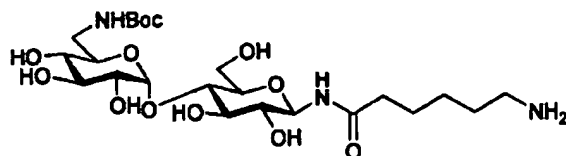
【0040】参考例9 6-アミノヘキサノイル 6'- α -ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ- β -マルトシルアミンの合成

参考例8で得た 6-(N'-ベンジルオキシカルボニル)- α -アミノヘキサノイル 6'- α -ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ- β -マルトシルアミン 35 mg をメタノール 5 ml に溶かし、10%パラジウム炭素 15 mg を加え、水素雰囲気下で室温で 24 時間攪拌

した。反応溶液をセライトろ過した後、ろ液を減圧下で濃縮し、目的物 27 mg を得た。6-アミノヘキサノイル 6'- α -ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ- β -マルトシルアミンは下記構造式(式中、Boc は α -ブトキシカルボニル基を示す)を有する。

【0041】

【化15】



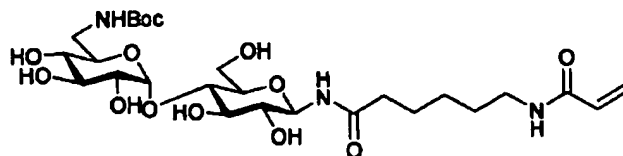
【0042】参考例10 6-アクリロイルアミノヘキサノイル 6'- α -ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ- β -マルトシルアミンの合成

参考例9で得た 6-アミノヘキサノイル 6'- α -ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ- β -マルトシルアミン 27 mg を蒸留水 5 ml に溶解し、1 N 水酸化ナトリウム水溶液を 0.06 ml 加えた。さらに、塩化アクリロイル 6 mg を含むテトラヒドロフラン 0.5 ml を氷冷下攪拌しながら滴下した。このとき、pH 8.5 を保つように適宜 0.2 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を調整した。約 2 時間攪拌後、1 N 塩酸で反

応液を中和し、凍結乾燥した。残渣を 70% エタノールで溶解し、Sephadex LH-20 (アマシヤムファルマシア製) カラムクロマトグラフィー(溶出液 70% エタノール)を用いて精製し、目的物 12 mg を得た。6-アクリロイルアミノヘキサノイル 6'- α -ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ- β -マルトシルアミンは下記構造式(式中、Boc は α -ブトキシカルボニル基を示す)を有する。

【0043】

【化16】



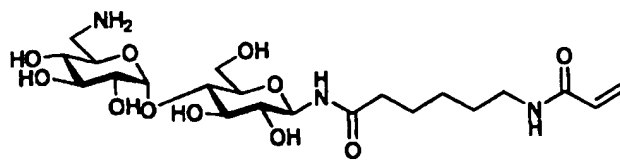
【0044】実施例2 6-アクリロイルアミノヘキサノイル 6'- α -ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ- β -マルトシルアミンの合成

参考例10で得た 6-アクリロイルアミノヘキサノイル 6'- α -ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ- β -マルトシルアミン 12 mg をとり、これに 30% トリフロロ酢酸水溶液 5 ml を加え、室温で 30 分間攪

拌した。反応後、反応液にジエチルエーテルを加え、生成物を沈殿させた。沈殿をジエチルエーテルで数回洗浄した後、これを乾燥させ、目的物 9 mg を得た。6-アクリロイルアミノヘキサノイル 6'- α -ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ- β -マルトシルアミンは下記構造式を有する。

【0045】

【化17】



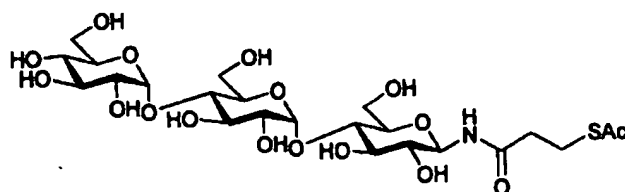
【0046】参考例11 3-S-アセチルチオプロビ
オイルβ-マルトトリオシルアミンの合成

マルトトリオース15.5gと炭酸水素アンモニウム94gを蒸留水100mlに溶かし、室温で5日間攪拌した。反応後、反応溶液を減圧下で濃縮し、炭酸水素アンモニウムの匂いが消えるまでトルエンで共沸を繰り返した。その残渣と3-S-アセチルメルカプトプロピオン酸5.3gを乾燥ジメチルホルムアミド100mlに溶かし、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド5.7gと1-ヒドロキシベンゾ

トリアゾール-水和物4.6gを加え、室温で24時間攪拌した。反応後、反応溶液をクロロホルムで洗浄し、水で抽出を行ない、減圧下で濃縮した。この残渣をSephadex LH-20カラムクロマトグラフィー(溶出液 95%エタノール)を用いて精製し、目的物8.4gを得た。3-S-アセチルチオプロビオイルβ-マルトトリオシルアミンは下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0047】

【化18】



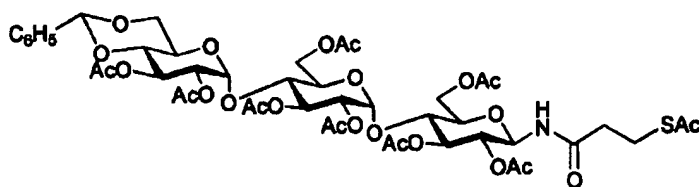
【0048】参考例12 3-S-アセチルチオプロビ
オイル2,3,6,2',3',6',2'',3''-オク
ター-O-アセチル-4'',6''-O-ベンジリデン-
β-マルトトリオシルアミンの合成

参考例11で得た3-S-アセチルチオプロビオイルβ-マルトトリオシルアミン6.4gをピリジン100mlに溶かし、ベンザルプロミド2.8gを加えて65℃にて1時間攪拌した。その反応溶液を室温に戻した後に無水酢酸150mlを加え、室温で24時間攪拌した。反応溶液をクロロホルムで抽出した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、次いで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸

ナトリウムを用いて乾燥させ、セライトろ過で硫酸ナトリウムを除いた後、ろ液を減圧下で濃縮した。その残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液 トルエン：酢酸エチル=2:1)で精製し、目的物2.2gを得た。3-S-アセチルチオプロビオイル2,3,6,2',3',6',2'',3''-オクター-O-アセチル-4'',6''-O-ベンジリデン-β-マルトトリオシルアミンは下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0049】

【化19】



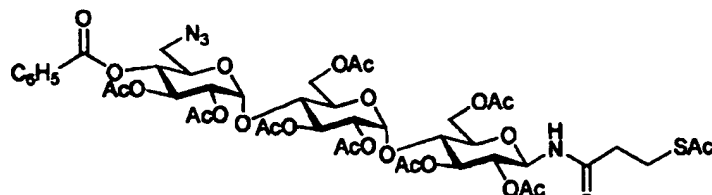
【0050】参考例13 3-S-アセチルチオプロビ
オイル2,3,6,2',3',6',2'',3''-オク
ター-O-アセチル-6''-アジド-4''-O-ベンゾ
イル-6''-デオキシ-β-マルトトリオシルアミンの
合成

参考例12で得た3-S-アセチルチオプロビオイル2,3,6,2',3',6',2'',3''-オクター-O-アセチル-4'',6''-O-ベンジリデン-β-マルトトリオシルアミン2.1gを乾燥ジクロロエタン50mlと四塩化炭素100mlからなる混合溶媒に溶かし、N-プロモコハク酸イミド1.1gと炭酸バリウム230mgを加えて、65℃で3時間攪拌した。その

後、反応溶液にジメチルホルムアミド100mlとアジ化ナトリウム2gを加え、120℃にて24時間攪拌した。反応溶液をクロロホルムで抽出した後、水で洗浄し、減圧下で濃縮した。その残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液 トルエン：酢酸エチル=2:1)にて精製し、目的物589mgを得た。3-S-アセチルチオプロビオイル2,3,6,2',3',6',2'',3''-オクター-O-アセチル-6''-アジド-4''-O-ベンゾイル-6''-デオキシ-β-マルトトリオシルアミンは下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0051】

【化20】

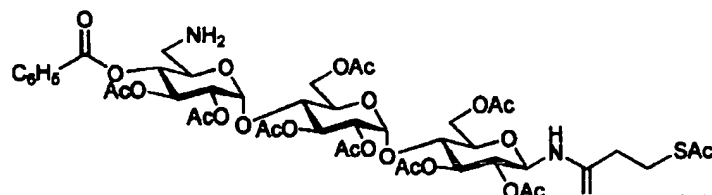


【0052】参考例14 3-S-アセチルチオプロピオイル2, 3, 6, 2', 3', 6', 2'', 3''-オクタ-O-アセチル-6''-アミノ-4''-ベンゾイル-6''-デオキシ-β-マルトトリオシルアミンの合成
参考例13で得た3-S-アセチルチオプロピオイル2, 3, 6, 2', 3', 6', 2'', 3''-オクタ-O-アセチル-6''-アジド-4''-O-ベンゾイル-6''-デオキシ-β-マルトトリオシルアミン550mgをメタノール50mlに溶かし、10%パラジウム炭

素30mgを加え、水素雰囲気下で24時間撹拌した。反応液をセライトろ過した後、ろ液を減圧濃縮し、目的物510mgを得た。3-S-アセチルチオプロピオイル2, 3, 6, 2', 3', 6', 2'', 3''-オクタ-O-アセチル-6''-アミノ-4''-ベンゾイル-6''-デオキシ-β-マルトトリオシルアミンは下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0053】

【化21】



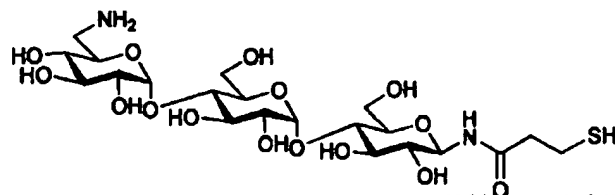
【0054】実施例3 3-メルカプトプロピオイル6''-アミノ-6''-デオキシ-β-マルトトリオシルアミンの合成

参考例14で得た3-S-アセチルチオプロピオイル2, 3, 6, 2', 3', 6', 2'', 3''-オクタ-O-アセチル-6''-アミノ-4''-ベンゾイル-6''-デオキシ-β-マルトトリオシルアミン107mgを乾燥メタノール20mlに溶かし、1.66Mナトリウムメチラート-メタノール溶液1.1mlを加え、室温

で24時間撹拌した。反応溶液をH⁺型にした陽イオン交換樹脂Dowex 50WX-8(ダウケミカル製)を用いて、pH7に中和した後、樹脂をろ別した。ろ液を減圧濃縮して、目的物55mgを得た。3-メルカプトプロピオイル6''-アミノ-6''-デオキシ-β-マルトトリオシルアミンは下記構造式を有する。

【0055】

【化22】

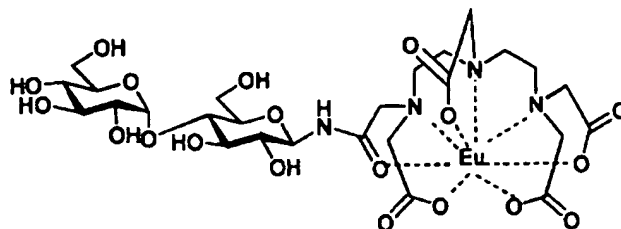


【0056】参考例15 N, N', N'', N'''-テトラカルボキシメチルジエチレントリアミノアセチル-β-マルトシルアミン-ユウロピウム錯体の合成
マルトース50mgと炭酸水素アンモニウム10gを蒸留水50mlに溶かし、室温で5日間撹拌した。反応後、反応溶液を減圧下で濃縮し、炭酸水素アンモニウムの匂いが消えるまでトルエンで共沸を繰り返した。その残渣に無水ジエチレントリアミン-N, N', N'', N'''-五酢酸149mgを加え、10%炭酸水素ナトリウム水溶液3mlに溶かし、室温で2時間撹拌した。Sephadex G-10(アマシャムファルマシア製)カラムクロマトグラフィー(溶出液 蒸留水)

を用いて精製した。生成物画分を凍結乾燥し、得られた固形物10mgを蒸留水2mlに溶解し、酢酸ユウロピウム9mgを加え、室温で1時間撹拌した。反応液をSephadex G-10(アマシャムファルマシア製)カラムクロマトグラフィー(溶出液 蒸留水)を2回行い、精製し、目的物45mgを得た。N, N', N'', N'''-テトラカルボキシメチルジエチレントリアミノアセチル-β-マルトシルアミン-ユウロピウム錯体は下記構造式を有する。

【0057】

【化23】



【0058】実施例4 DELFIA (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoro-immunoassay) による各種マルトオリゴ糖誘導体とマルトース結合蛋白質との親和性の評価

96穴マイクロプレートに200nMマルトース結合蛋白質の25mMリン酸緩衝液(pH7.4、0.9%NaCl含有、以下PBSと略する)溶液0.1mlを加えて、4℃で24時間インキュベートを行ない、マルトース結合蛋白質溶液を取り除いた後に3度、PBS

(0.05%Tween20含有)0.2mlで洗浄し、プレート上にマルトース結合蛋白質をコーティングした。次に、様々な濃度のマルトオリゴ糖誘導体と参考例15で得たN, N', N'', N'''-テトラカルボキシメチルジエチレントリアミノアセチル-β-マルトシルアミン-ユウロピウム錯体を3μM含む混合溶液を調製し、マルトース結合蛋白質をコーティングしたプレート穴に50μlづつ加え、室温で30分間静置した。その後、混合溶液を取り除き、8度PBS(0.05%Tween20含有)0.2mlで洗浄した後に、エンハン

スメント溶液(50μM酸化トリオクチルホンフィン、15μM4,4'-トリプロロ-1-(2-ナフチル)-1,3-ブタンジオン、0.1%トリトンX-100を含む0.1M酢酸-フタル酸水素カリウム緩衝液(pH3.2))0.15mlを加え、15分間振動させた。そして、遊離したユウロピウムイオン濃度を蛍光光度計で測定(励起波長340nm、蛍光波長615nm)した。マルトオリゴ糖誘導体濃度に対して遊離したユウロピウムイオン濃度をプロットし、マルトース結合蛋白質とN, N', N'', N'''-テトラカルボキシメチルジエチレントリアミノアセチル-β-マルトシルアミン-ユウロピウム錯体との結合に対する阻害定数を求めた。マルトオリゴ糖誘導体としては、マルトース、マルトトリオース、実施例1~3で得たマルトオリゴ糖誘導体を用いた。各々対応するマルトオリゴ糖に比べ、マルトオリゴ糖誘導体の方がマルトース結合蛋白質に対する親和性が向上していた。

【0059】

【表1】

	阻害定数 (IC ₅₀)
マルトース	700 μM
マルトトリオース	1.2 μM
実施例1	3 μM
実施例2	1.2 μM
実施例3	0.3 μM

【0060】実施例5 6-アミノヘキサノイル-β-マルトシルアミン結合セファロースの調製

実施例1で得た6-アミノヘキサノイル-β-マルトシルアミン23mgを50mMHEPES緩衝液(pH7.0)5mlに溶かし、予め1mM塩酸で洗浄したNHS活性化Sephrose 4FF(アマシャムファルマシア製)2mlを加え、室温で4時間穏やかに振とうした。樹脂をろ別し、これに50mMTriis-HCl緩衝液(pH8.0)を5ml加え、室温で4時間穏やかに振とうすることにより樹脂上に残存する活性部位をブロックした。50mM酢酸緩衝液(pH4.0)、50mMTriis-HCl緩衝液(pH8.0)で交互に3回ずつ洗浄し、20mMTriis-HCl緩衝液(pH8.0)の中で冷蔵保存した。

【0061】実施例6 6-アクリロイルアミノヘキサノイル6'-アミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミンとアクリルアミドとの共重合体(1:1000)の調製

実施例2で得た6-アクリロイルアミノヘキサノイル6'-アミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミン5mgおよびアクリルアミド710mgを蒸留水25mlに溶解し、ここにN, N'-メチレンビスアクリルアミド57mg、N, N', N'', N'''-テトラメチルエチレンジアミン10μlを加え、溶解した。溶液を4℃に冷やし、ここに10%ペルオキシ二硫酸アンモニウム水溶液125μlを添加し、1時間重合させた。重合後、得られたゲルを凍結乾燥し、共重合体750mgを得た。共重合体はホモジライズした後、20mMTriis

ーHCl緩衝液(pH8.0)の中で冷蔵保存した。

【0062】実施例7 3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"-デオキシ-β-マルトトリオシルアミン結合セファロースの調製

実施例3で得た3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"-デオキシ-β-マルトトリオシルアミン29mgを50mMHEPES緩衝液(pH7.0)5mlに溶かし、活性化Thiol Sepharose 4FF(アマシヤムファルマシア製)2mlを加え、室温で12時間穏やかに振とうした。樹脂をろ別し、0.1%牛血清アルブミンを含む25mMHEPES緩衝液(pH7.4)で十分洗浄した後、20mMTris-HCl緩衝液(pH8.0)の中で冷蔵保存した。

【0063】参考例15 β1,4-ガラクトース転移酵素の活性測定法

適当な濃度の酵素液40μlを19mMD-グルコース、0.37mMUDP-ガラクトース、0.14mMβ-NADH、1.3mMホスホエノールピルビン酸、17.5Uピルビン酸キナーゼ、25U乳酸脱水素酵素、5.0mM塩化マンガン水溶液、0.02%α-ラクトアルブミンを含む52mMグリシルグリシン緩衝液(pH8.4)3.025mlに加え、30℃で約10min反応させ、340nmにおける吸光度(以下、A340と示す)の減少を記録した。ブランクとして酵素液の代わりに20mMTris-HCl緩衝液(pH7.5、2mMエチレンジアミン四酢酸・4Na、2mM2-メルカプトエタノールを含む)を用いた。テストおよびブランクの最大ΔA340/分を求め、以下の算出式に従い活性を算出した。

$$U/ml = (\Delta A340/分(テスト) - \Delta A340/分(ブランク)) \times 3.065 \div 6.022 \div 0.04$$

【0064】なお、α-ラクトアルブミン存在下、30℃、pH8.4で1分間にUDP-ガラクトースよりD-グルコースへガラクトース1μmol転移させる酵素量を1Uと定義した。

【0065】参考例16 MBP-β1,4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質の調製

ヒト胎盤より取得したβ1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子より膜結合部位をコードする部分を取り除いた遺伝子をベクターpMAL-p2(NEB社製)のEcoRIおよびSalIサイトに挿入し、MBP-β1,4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質発現ベクターpMG-P21を調製した。該発現ベクターpMG-P21でエシェリヒア・コリ(Escherichia coli)JM109を形質転換し、MBP-β1,4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質生産菌エシェリヒア・コリJM109(pMG-P21)を得た。本菌を0.2%グルコースおよびアンピシリン50mg/Lを含むLB培地50mlの入った500ml容坂口フラスコに植菌し、37℃、16時間、180rpmで振とう培養した。得られた培養液

を上記培地3Lの入った5L容ジャーファメンターに30ml植菌し、25℃、通気量1.5L/分、6時間、300rpmで撹拌し培養した。その後、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを0.3mMになるように添加し、さらに18時間培養を続けた。得られた培養液を遠心分離し、菌体を集めた。集めた菌体を0.1MNaCl、1mMエチレンジアミン四酢酸・2Na、10mM2-メルカプトエタノールを含む20mMTris-HCl(pH7.4;以下、カラムバッファー(pH7.4、0.1MNaCl)と示す)150mlで懸濁し、超音波破碎機により、菌体を破碎し、融合蛋白質を抽出した。

【0066】破碎液を遠心分離し、無細胞抽出液155mlを得た。無細胞抽出液のβ1,4-ガラクトース転移酵素活性は1.4U/mlであり、比活性は80mU/mg-蛋白質であった。得られた無細胞抽出液にポリエチレンイミンを0.7%になるまで撹拌しながら徐々に加えた。このときpHが8を越えないようにHClでpHを調節した。添加後、さらに30分間撹拌を続けた。生じた沈殿を遠心分離で取り除き、上清160mlを得た。ここに、硫酸アンモニウムを75.5g(70%飽和)4℃で撹拌しながら徐々に加えた。添加後、さらに1時間撹拌を続けた。生じた沈殿を遠心分離にて集めた。得られた沈殿をカラムバッファー(pH8.0)で再溶解し、30mlにした。これを透析(外液はカラムバッファー(pH8.0))により、脱塩した。予めカラムバッファー(pH8.0)で平衡化したDEAE-Sepharose CL6B(アマシヤムファルマシア製)を50ml充填したカラムに、脱塩した酵素液を吸着させ、同バッファー150mlで洗浄後、同バッファー250mlおよびカラムバッファー(pH8.0、0.1MNaCl)250mlを用いたリニアグラジェントにより溶出させることにより、MBP-β1,4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質画分18mlとして精製した。得られた精製酵素液は活性6.2U/ml、比活性3.2U/mg-蛋白質であった。

【0067】参考例17 固定化β1,4-ガラクトース転移酵素の活性測定法

固定化1,4-ガラクトース転移酵素を適量とり、100nM PA化オリゴ糖(GlcNAcβ1→2Manα1→3(GlcNAcβ1→2Manα1→6)Manβ1→4GlcNAcβ1→4GlcNAc-P A)、200μMUDP-Gal、10mM塩化マンガン、α-ラクトアルブミン0.26mg/mlを含む25mMHEPES緩衝液(pH7.5)100μl中、20℃で1時間振とう撹拌しながら反応させた。反応後、生成物をHPLCにより定量した。参考例15の活性測定法で予め活性を測定した酵素液を用いて、上記活性測定反応を行い、生成物量からガラクトース転移量を求め、検量線を作成し、その検量線より活性を算出し

た。

【0068】実施例8 β 1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化(その1)

実施例5で得た6-アミノヘキサノイル- β -マルトシルアミン結合セファロース50 μ lをとり、これに参考例16で得た精製酵素液50 μ lおよびカラムバッファー(pH8.0)200 μ lを加え、4℃で穏やかに2時間振とうした。遠心分離により上清を取り除き、カラムバッファー(pH8.0)200 μ lで2回洗浄することにより、固定化 β 1, 4-ガラクトース転移酵素を得た。洗浄液を上清とあわせて回収液とした。回収液および固定化 β 1, 4-ガラクトース転移酵素の酵素活性を測定し、活性回収率を算出した。固定化酵素の活性は420mU/ml-樹脂であり、活性回収率は22%であった。

【0069】実施例9 β 1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化(その2)

実施例5で得た6-アミノヘキサノイル- β -マルトシルアミン結合セファロースの代わりに実施例6で得た6-アクリロイルアミノヘキサノイル6'-アミノ-6'-デオキシ- β -マルトシルアミンとアクリルアミドとの共重合体を用いる以外は実施例8と同様にして固定化 β 1, 4-ガラクトース転移酵素を調製した。得られた固定化酵素の活性は330mU/ml-樹脂であり、活性回収率は23%であった。

【0070】実施例10 β 1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化(その3)

実施例5で得た6-アミノヘキサノイル- β -マルトシルアミン結合セファロースの代わりに実施例7で得た3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"-デオキシ- β -マルトトリオシルアミン結合セファロースを用いる以外は実施例8と同様にして固定化 β 1, 4-ガラクトース転移酵素を調製した。得られた固定化酵素の活性は470mU/ml-樹脂であり、活性回収率は21%であった。

【0071】実施例11 β 1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化(その4)

参考例16で得た精製酵素液50 μ lおよびカラムバッファー(pH8.0)200 μ lの代わりに参考例16で得た無細胞抽出液250 μ lを用いる以外は実施例10と同様にして固定化 β 1, 4-ガラクトース転移酵素を調製した。得られた固定化酵素の活性は400mU/

ml-樹脂であり、活性回収率は20%であった。

【0072】比較例1 アミロースレジン(NEB社製)への β 1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化
実施例7で得た3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"-デオキシ- β -マルトトリオシルアミン結合セファロースの代わりにアミロースレジンを用いる以外は実施例9と同様にして、固定化 β 1, 4-ガラクトース転移酵素を調製した。しかし、固定化酵素としての活性は認められなかった。活性は全て回収液として回収されており、アミロースレジンには酵素は結合していなかった。

【0073】実施例12 3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"-デオキシ- β -マルトトリオシルアミン結合セファロースを用いたMBP- β 1, 4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質の精製

実施例7で得た3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"-デオキシ- β -マルトトリオシルアミン結合セファロース1mlをカラムに充填し、参考例16で得た無細胞抽出液0.5mlを通液し、融合蛋白質を吸着させた。吸着後カラムバッファー(pH7.4、0.1MNaCl)5mlでカラムを洗浄した。洗浄後、10mMマルトースを含むカラムバッファー(pH7.4、0.1MNaCl)3mlで融合蛋白質を溶出させ、 β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性画分を集めた。得られた酵素液の比活性は1.1U/mg-蛋白質であり、約13倍向上していた。

【0074】比較例2 アミロースレジン(NEB社製)を用いたMBP- β 1, 4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質の精製

実施例7で得た3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"-デオキシ- β -マルトトリオシルアミン結合セファロースの代わりにアミロースレジン(NEB社製)を用いて、実施例12と同様にして融合蛋白質を吸着させようとしたが、融合蛋白質は吸着せず、洗浄液中に活性が回収され、精製できなかった。

【0075】

【発明の効果】上述したように、本発明の高分子担体上にマルトオリゴ糖誘導体を結合させたマルトース結合蛋白質リガンドを利用することにより、マルトース結合蛋白質との融合蛋白質として発現させた酵素を効率よく、しかも容易に精製したり、固定化することができる。

フロントページの続き

(72)発明者 西村 紳一郎
北海道札幌市中央区北9条西16丁目1番1号320

(72)発明者 黒河内 政樹
北海道札幌市北区北20条西5丁目20番地エ
ルムハ イツ中島401号

(72)発明者 山田 久里子
北海道札幌市北区麻生町7丁目1番1号
311
(72)発明者 ユアン チュアン リー
アメリカ合衆国メリーランド州21093、チ
モニウム、サヴォコート 1824

Fターム(参考) 4B033 NA25 NA45 NB04 NB13 NB34
NB36 NB44 NC04 NC13 ND03
ND20
4C057 BB03 BB04 CC03 CC04 DD03
HH02
4H045 AA10 BA41 BA60 BA62 DA89
EA60 EA65 FA74 FA82 GA26
4J100 AB02P AB07P AG02P AG04P
AJ02P AL03P AL08P AM15P
BA02H BA03H BA03P BA28H
BA33P BA34H BA51H BC53H
CA01 CA04 CA31 HA19 HA33
HA55 HA61 JA50

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**